

· 研究论文 ·

补体活化的体外评价模型建立及应用

冯彩霞^{1†}, 修宪^{2†}, 田伟³, 王瑜玲¹, 王红叶², 王雅娟^{2*}

(1. 石家庄市第五医院, 河北 石家庄 050021; 2. 石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 河北 石家庄 050035; 3. 河北中医学院, 河北 石家庄 050200)

摘要: 补体激活相关的假性过敏反应 (complement activation-related pseudo-allergic reactions, CARPA) 占全部免疫介导的直接过敏反应的 77%。由于 CARPA 临床普遍性, 以及该反应与药物理化性质的相关性, 补体活性检测被建议作为药物免疫毒性和药物一致性的评价指标之一。但是, 由于补体活性的体内检测较为复杂、不同个体之间以及人与动物之间存在免疫差异, 使得有必要建立一个标准、快捷的模型, 用于评价药物对补体活性的影响。本研究使用人混合血清作为标准反应血清, 通过加入热聚集 IgG 和酵母多糖激活血清得到标准阳性对照, 将 SC5b-9、C5a、C4d 和 Bb 作为检测指标并确定评价标准, 建立了药物对补体活性影响的体外评价模型。应用该评价模型, 以抗真菌类药物两性霉素 B 的不同处方和注射用伏立康唑为研究对象, 对这些药物的免疫毒性以及仿制与市售制剂的一致性进行了初步评价。

关键词: 过敏反应; 补体; 体外评价; 两性霉素 B; 伏立康唑

中图分类号: R967

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 05-0722-07

Establishment of *in-vitro* model of complement activation and its application

FENG Cai-xia^{1†}, XIU Xian^{2†}, TIAN Wei³, WANG Yu-ling¹, WANG Hong-ye², WANG Ya-juan^{2*}

(1. The Fifth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050021, China; 2. CSPC ZhongQi Pharmaceutical Technology (Shijiazhuang) Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China; 3. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China)

Abstract: Complement activation-related pseudo-allergic reactions (CARPA) may represent 77% of all immune-mediated immediate hypersensitivity reactions. Because of the universality of the CARPA response and correlation between it and drug properties, complement activity tests are recommended as one of the tests for immunotoxicity and bioequivalence of drugs. However, *in-vivo* tests of complement activation are complicated, and the immunological differences between different individuals and between human and animal, making it very necessary to establish a standard and sample evaluation model for testing the effects of drugs on complement activity. In this study, the standard reaction serum was prepared by pooling sera collected from 40 healthy blood donors; a standard positive control was prepared by incubation with a heat-agglutinated IgG and zymosan A; SC5b-9, C5a, C4d and Bb were chosen as the test targets and evaluation criteria of the results was defined, all of these constituted the *in-vitro* model. By using this *in-vitro* model, the immunological toxicity of the different prescription of antifungal drug amphotericin B, and voriconazole for injection, and the bioequivalence of amphotericin B liposome formulations were studied.

Key words: hypersensitivity reaction; complement; *in-vitro* model; amphotericin B; voriconazole

收稿日期: 2016-11-15; 修回日期: 2016-12-27.

基金项目: 国家“十二五”重大新药创制资助项目 (2014ZX09507001); 石家庄市科技支撑计划 (151461193).

†共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-311-67808853, E-mail: wangyajuan@mail.ecspc.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1107

过敏反应 (hypersensitivity reactions, HSRs) 传统上被分为 4 类, 分别是 I~IV 型, 其中 I 型过敏反应被定义为 IgE 介导的急性反应, 其他几类分别是由 IgG、免疫复合物或者是淋巴细胞引发或介导的亚急性或慢性免疫变化^[1]。但是临床上还存在一种急性过敏反应, 符合 I 型过敏反应的标准, 却不需要 IgE 诱发或介导, 这类反应占全部免疫介导的直接过敏反应的 77%^[2], 严重时可导致患者死亡^[3]。已知能够诱发这类反应的物质包括造影剂、非类固醇类抗炎药物、止痛剂、吗啡、昆虫毒液、脂质体和胶束溶剂 (如紫杉醇注射液中的 Cremophor EL), 其中脂质体、造影剂和 Cremophor EL 引起的过敏反应都由补体激活引发, 因此, 这类抗原激活补体引发的过敏反应被暂时命名为补体激活相关的假性过敏反应 (complement activation-related pseudo-allergic reactions, CARPA)^[4-6]。

由于 CARPA 普遍性, 美国 FDA 建议在药物免疫毒性检测中增加体外或/和体内的补体活性检测, 以便更好地预测药物在临床上发生假性过敏反应的风险^[7]。此外, 由于 CARPA 与药物的理化性质有关, 因此, 药物对补体活性影响的检测也被建议用于仿制与参比制剂的一致性评价^[8]。

在进行药物对补体活性影响的体内检测时, 由于不同物种的免疫系统存在差异, 导致不同物种对药物的敏感性和反应强度不同, 常用的实验动物 (如大鼠和小鼠) 并不适用于此项研究, 有文献报道, 猪是最敏感的模型, 而在某些指标上犬也有明显优势^[9], 此外, 不同个体对药物的免疫反应也存在差异, 因此需要较大的样本量来保证结果的真实性^[6, 8]。综上所述, 开展动物体内实验操作复杂, 且成本高。

在进行药物对补体活性影响的体外检测时, 通常通过 ELISA 的方法检测各补体因子的含量变化^[4-8]。目前, 商业化用于检测动物补体因子的 ELISA 试剂盒或抗体非常少, 仅可以检测补体因子 C3^[8], 检测其他补体因子仍十分困难。此外, 由于动物与人的补体系统存在差异, 使用动物血清与人血清进行的实验得到结果可能不一致, 仅可作为参考。但是, 如果使用人血清进行体外实验, 则存在血清样本很难获得和不同检测批次之间的结果难以比较的问题。

为了解决上述问题, 本研究将采集得到的人血清混合后作为标准反应血清, 并考察了放置对其稳定性和活性的影响; 通过加入热聚集 IgG 和酵母多糖刺激标准反应血清制备得到标准阳性对照; 将 SC5b-9、C5a、C4d 和 Bb 作为检测指标, 并确定结果的评价标准, 最终建立了药物对补体活性影响的体

外评价模型。

该模型具有以下优点: ① 能够快捷、经济地对多种药物进行补体激活的评价, 尤其适用于药物的处方筛选和多个批次药物的评价; ② 使用人血清作为反应血清避免了动物和人之间的差异, 并通过将 40 个个体血清混合避免了个体间的差异; ③ 通过考察稳定性, 确定血清在合适的保存条件下稳定, 解决了反应血清来源的问题; ④ 通过使用标准阳性对照, 可以比较不同检测批次之间的结果。

本文以抗真菌类药物两性霉素 B 的不同处方和注射用伏立康唑作为研究对象, 对该评价模型在药物的免疫机制研究、免疫毒性评价和药物的一致性评价等方面的应用开展了初步研究。

材料与方法

仪器 多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司, Varioskan Flash)。

试剂与药品 真空促凝采血管购自鑫乐医疗器械股份有限公司; 人免疫球蛋白 IgG 和酵母多糖 zymosan A 购自 Sigma 公司, 货号分别为 14506 和 Z4250; 甲磺酸萘莫司他购自 Santa Cruz 公司, 货号 SC-201307; 人补体 SC5b-9、C4d 和 Bb 因子 ELISA 试剂盒购自 Quide 公司, 货号分别为 A020、A008 和 A027; 人补体 C5a 试剂盒购自 BD Bioscience 公司, 货号为 557965; 补体活性评价试剂盒购自 EURO Diagnostica 公司, 货号为 CompL300; 两性霉素 B 脂质体 (Ambisome, 吉利德公司, 批号分别为 0424A3AA、005783 和 005608); 自制两性霉素 B 脂质体 (L-AMB, 批号为 150416 和 151104), 自制两性霉素 B 胆固醇硫酸钠复合物 (ABCD, 批号: 443130901), 注射用伏立康唑 (VF-S, 仿 Vfend, 批号: 140502) (石药集团)。注射用两性霉素 B (d-Amb, 华北制药, 批号 FCLD151101); 注射用伏立康唑 (Vfend, 辉瑞制药, 批号: 0856002)。

血清的采集与保存 本研究使用的血清采集自 40 例健康志愿者, 在采集之前已经告知志愿者采集的血液样品用于药物补体反应的体外相关研究, 并经过志愿者同意。之后 40 个志愿者的全血用 10 mL 真空玻璃促凝采血管收集。全血在室温放置 30 min 使其凝固, 之后用 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集血清。每份样品分别分装后于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。此外, 分别从 40 份样品中取 200 μL 置于 15 mL 离心管中制成标准反应血清, 充分混合后, 分装, 于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

检测血清样品中 3 条补体途径的活性 使用补体途径活性检测试剂盒来检测血清样品中 3 条途径中的补体因子是否具有活性^[10]。血清样品取出后在 37 °C 水浴中快速融化, 之后立刻置于冰上。实验设置如下: 标准反应血清组 (serum)、各个途径的阳性对照 (positive control, PC)、阴性对照 (negative control, NC) 和稀释液组 (blank), 所有样品按照说明书要求的稀释倍数稀释, 取 100 μL 稀释后样品加入到对应孔中孵育, 洗涤后加入碱性磷酸酶标记的 SC5b-9 抗体, 最后检测光吸收值。按照说明书中%补体活性的公式: $\text{Complement activity (\%)} = (\text{sample-NC}) / (\text{PC-NC})$, 计算标准反应血清中各个补体途径的%补体活性。

考察反复冻融对血清中补体活性的影响 标准反应血清取出后在 37 °C 的水浴中快速融化, 之后立刻置于冰上, 取出部分样品用于检测, 剩余样品再次冻存到 -80 °C, 共反复冻融 3 次。将冻融不同次数的血清都分成两份, 一份加入热聚集 IgG (HAIgG) 和酵母多糖 (zymosan A) 激活, 检测补体因子 SC5b-9 含量的变化 (激活方法参照标准阳性对照的制备方法); 另一份血清直接检测 SC5b-9。

标准阳性对照的制备 根据文献中的方法^[11], 在标准反应血清中加入 HAIgG (100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 人 IgG 溶液于 63 °C 加热 15 min, 之后立刻置于冰上直到 IgG 沉淀) 和 zymosan A, 激活血清中的各补体成分, 用该激活血清作为标准阳性对照, 用于不同检测批次之间的相对定量。得到的标准阳性对照血清分装后保存于 -80 °C。

体外补体激活 按照文献中方法^[6, 12, 13], 血清取出后在 37 °C 的水浴中快速融化, 之后立刻置于冰上, 从中取出 40 μL 血清加入 10 μL 药物, 在 37 °C 振荡水浴 (80 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 中孵育 30 min, 反应结束后, 加入浓度为 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 终止反应, 之后样品放置于冰上以备检测或置于 -80 °C 保存。

体外补体活性检测 激活后的血清样品用样品稀释液稀释 20 倍, 取 100 μL 加入到 SC5b-9 ELISA 试剂盒的 96 孔板中, 后续操作按照 SC5b-9 的说明书进行, 最后在 450 nm 处检测吸光度值并计算浓度。其他补体活性因子 C5a、C4d 和 Bb 检测方法如下: 激活后的血清样品按照各自说明书的建议稀释, 加入到 ELISA 试剂盒的对应孔中, 后续操作按照各自的说明书进行, 在 450 nm 处测光吸收值并计算浓度。

统计分析 实验的检测结果用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示 ($n=3$), 采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理, 采用 t 检验进行显著性分析。

结果

1 标准反应血清的补体活性检测

补体系统有 3 条途径, 分别为经典途径 (classical pathway, CP)、替代途径 (alternative pathway, AP) 和甘露聚糖结合凝集素途径 (mannan-binding lectin pathway, MBL-P)。补体途径活性检测试剂盒中微孔板分别用 CP、AP 和 MBL-P 途径的特异性激活因子 IgM、脂多糖 (LPS) 和甘露糖包被, 被检测的血清样品分别用 3 条途径特异性的稀释液稀释, 稀释液中含有特殊的阻断剂, 可以保证只有特定的途径被激活, 当血清加入到对应的孔中, 相应的补体因子被激活, 最后通过检测不同通路共同的终产物 SC5b-9 来评价血清样品中 3 条途径的活性。通过检测发现, 与试剂盒的 PC 组相比, 在 CP 途径与 AP 途径中, 标准反应血清的光吸收值略低于对照, MBL-P 途径标准反应血清的光吸收值与对照基本一致 (图 1)。按照计算公式, 各途径的补体活性分别为: CP 途径 79.6%、MBL-P 途径 97.2% 和 AP 途径 90.7%。

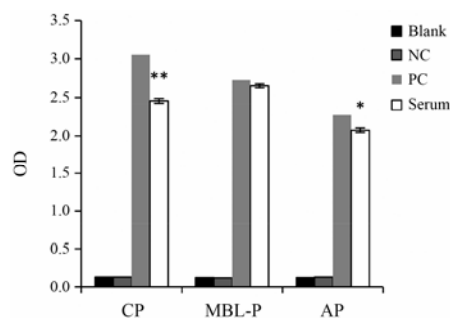


Figure 1 Three complement pathway activity of standard reaction serum. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PC group. AP: Alternative pathway; Blank: Diluent for three pathways; CP: Classical pathway; MBL-P: Mannan-binding lectin pathway; NC: Negative control; PC: Positive control; Serum: Standard reaction serum

2 标准阳性对照的制备

由于补体试剂盒的不同生产批次、不同的运输和保存条件或不同的操作条件, 都可能导致多次检测之间的结果不具有可比性, 因此, 通过制备标准的血清对照品, 每次检测时加入标准对照品对结果进行标定, 使不同的检测批次之间可以互相比较。由于 HAIgG 可以激活补体的 CP 途径, 而 zymosan A 可以激活 MBL-P 和 AP 途径, 按照文献^[11]中的方法, 向标准反应血清中加入 HAIgG 和 zymosan A, 可以得到所有补体因子都被激活的血清对照品。结果显示, 激活后血清与未激活的标准反应血清相比, 3 条补体途径的终产物 SC5b-9、过敏毒素 C5a、CP 途径的特异性

因子 C4d 及 AP 途径特异性因子 Bb 的含量都显著升高 (图 2)。

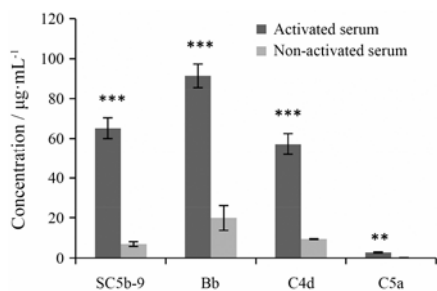


Figure 2 Concentration changes of complement factors in the standard positive control. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs non-activated serum

3 冻融次数对血清中补体活性的影响

标准反应血清在 -80°C 保存经过反复冻融后, 血清中的补体因子可能会失活或被非特性的激活, 因此需要考察反复冻融对血清的影响。SC5b-9 是 3 条补体途径的共同终点, 因此, 检测 SC5b-9 含量的变化能够反映血清中补体因子整体的变化。将需要检测的血清分成两份, 一份直接检测, 可以用来判断血清是否发生非特异性的激活; 另一份加入 HAIgG 和 zymosan A 激活, 可以用来判断血清中的补体因子是否失活。

从图 3 中可以看出, 标准反应血清在经过 3 次冻融之后, 血清中的 SC5b-9 含量没有明显变化; 加入 HAIgG 和 zymosan A 激活后, 不同冻融次数的血清中 SC5b-9 的含量都大幅增加, 并且不同冻融次数之间没有明显差异。

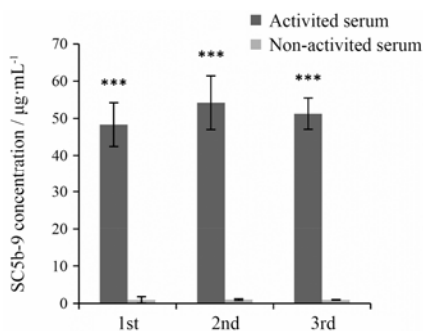


Figure 3 Effect of freeze-thaw times on complement activity of standard reaction serum. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P<0.001$ vs non-activated serum

4 体外考察注射用两性霉素 B 和注射用伏立康唑激活补体的能力

难溶性药物紫杉醇和多西他赛在制备成注射液时, 分别使用 Cremophor-EL 和 Tween-80 来增加其溶

解性, 已有文献^[1,14]报道, Cremophor-EL 和 Tween-80 注射到体内后能够引起体内的补体激活, 从而在临床上表现为 CAPRA。抗真菌药物两性霉素 B 和伏立康唑也是难溶性药物, 在制备成注射液时分别使用脱氧胆酸钠和磺丁基醚- β -环糊精作为增溶剂, 而至今尚无文献报道这两种制剂能否引起补体激活。因此, 本研究将注射用两性霉素 B 和注射用伏立康唑加入到标准反应血清中, 使用上述经 HAIgG 和 zymosan A 激活的标准阳性对照作为 PC, 以加入 5% 葡萄糖注射液的血清作为 NC, 通过比较补体系统的最终反应产物 SC5b-9 来判断这两类制剂能否激活补体。从图 4 中可以看出, 与 NC 组比较, 加入 Vfend 和 VF-S 之后, 血清中检测到的 SC5b-9 含量都没有增加, 而 d-AmB 组与 NC 组相比, 血清中的 SC5b-9 显著增加了 181% ($P<0.01$), 说明 d-AmB 能够引起血清中的补体激活, 而 Vfend 和 VF-S 不能。

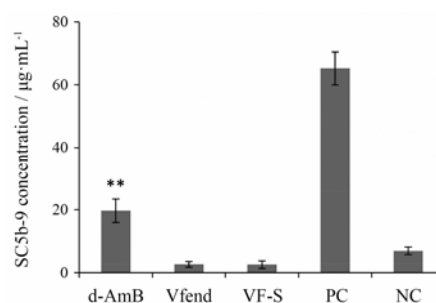


Figure 4 Complement activation by d-AMB, Vfend and VF-S in standard reaction serum. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P<0.01$ vs NC group

5 体外比较两性霉素 B 不同处方激活补体的能力

目前, 常见的市售两性霉素 B 有 3 种处方, 分别为两性霉素 B 脂质体 (Ambisome)、两性霉素 B 盘状复合物 (ABCD) 以及传统的两性霉素 B 脱氧胆酸钠注射液 (d-AmB)。有文献报道, Ambisome 在体内能够激活补体, 引起 CARPA^[12]; 而本研究结果也表明 d-Amb 在体外能引起补体激活; 此外, 有文献^[12]表明补体激活反应与药物粒子的形状有关, 例如阿霉素脂质体 (Doxil) 与未装载药物的空白脂质体相比, 形状接近椭球体, 而不是正球体, 更容易被补体系统识别, 因此, 与空白脂质体相比, 其激活补体的能力更强。ABCD 为盘状, 与球型的纳米粒相比形变较大, 该处方能否引起补体激活以及与其他两种处方相比激活补体的途径是否一致, 尚不得而知。因此, 本研究将两性霉素 B 不同处方加入到标准反应血清中, 使用标准阳性对照作为 PC, 以加入 5% 葡萄糖注射液的血清作为 NC, 通过比较 SC5b-9、C5a、C4d

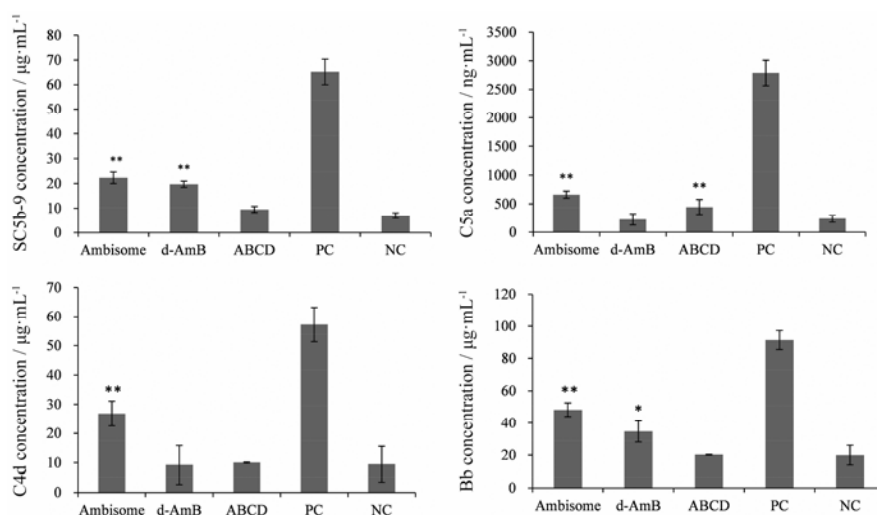


Figure 5 Complement activation by different formulations of amphotericin B in standard reaction serum. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group. ABCD: Amphotericin B lipid complex for injection; d-AmB: Sodium desoxycholate-amphotericin B for injection; Ambisome: Amphotericin B liposome for injection

及 Bb 的含量变化来判断这些处方能否激活补体以及激活的补体途径。由图 5 可以看出, 与 NC 组相比, Ambisome 和 d-AmB 组的 SC5b-9 含量都有明显升高, 分别增加了 218% 和 181%, 而 ABCD 组与 NC 组相比仅增加 35%。Ambisome 组检测到 C5a 的含量也有显著增加, 增加了 178%, ABCD 增加 86%, 而 d-AmB 组 C5a 的含量没有变化。ABCD 组的 C4d 和 Bb 因子的含量与 NC 组相比均没有变化, Ambisome 组 C4d 和 Bb 因子的含量与 NC 组相比都有显著升高, 分别增加了 181% 和 141%; d-AmB 组 C4d 含量与 NC 组相比没有差异, 而 Bb 的含量增加了 73%。这些结果表明, 3 种处方中, Ambisome 和 d-AmB 激活补体的能力较强, 其中 Ambisome 能够同时激活 CP 和 AP 两种途径, 而 d-AmB 仅能激活 AP 途径。

6 体外比较两性霉素 B 脂质体的一致性

对于脂质体或其他纳米粒药物, 其补体激活能力与药物粒子本身的性质, 如组成、粒径、电荷及粒子形状等有关, 有研究者建议药物对补体活性的影响可作为评价一致性的指标之一^[8]。根据文献和本文的研究结果可知, 两性霉素 B 脂质体能够在体外激活补体。因此, 本研究选择 3 批市售的两性霉素 B 脂质体 (吉利德公司, RLD1、RLD2 和 RLD3) 和自制的 2 批两性霉素 B 脂质体 (石药集团, Test1 和 Test2), 将相同剂量 (以两性霉素 B 计) 的自制和市售制剂加入到标准反应血清中孵育, 通过比较补体途径的共同终产物 SC5b-9 和过敏因子 C5a 的含量变化, 来比较自制和市售制剂激活补体能力的差异, 从而比较自制制剂和市售制剂的一致性。从图中可以看出, 与

血清孵育后, 3 批市售制剂血清中检测到 SC5b-9 的含量基本一致, 平均值为 $(22.16 \pm 0.63) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相对标准偏差 RSD 为 2.85%, 而 C5a 的含量则变化较大, 平均值为 $(571.32 \pm 106.12) \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相对标准偏差 RSD 为 18.6%。两批自制制剂血清中 SC5b-9 和 C5a 的含量与市售制剂的平均值相比都有显著性差异, 150416 批制剂含量低于市售制剂平均值, 另一批 151104 制剂则高于市售制剂 (图 6)。

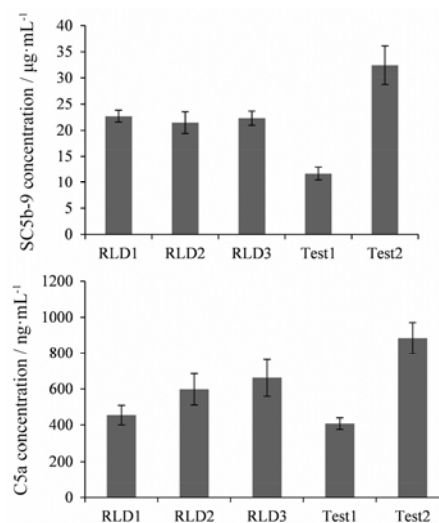


Figure 6 Complement activation by self-made (Test1, Test2) and commercial (RLD1, RLD2, RLD3) amphotericin B liposomes in standard reaction serum. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

讨论

CARPA 占全部免疫介导的直接过敏反应的 77%^[2], 已上市的一些脂质体药物 (如 Doxil 和 Ambisome) 和

小分子胶束药物 (如 Taxol 和 Taxotere) 在临床上能够引起补体激活, 从而导致 CARPA 发生。因此, 美国 FDA 建议在药物免疫毒性检测中增加体外或/和体内的补体活性检测, 以便更好地预测药物在临床上发生假性过敏反应的风险^[7]。此外, 由于 CARPA 与纳米粒药物的理化性质有关, 因此, 补体活性检测也被建议用于仿制药与被仿制剂的一致性评价^[8]。

由于动物补体活性检测实验的成本过高、操作复杂、使用动物血清开展体外实验可检测的参数少、动物的免疫系统与人体存在差异、使用人血清进行体外检测存在样本不好获取等问题, 使得不能很好地研究药物对补体活性的影响, 因此, 需要建立一个操作简单便捷、结果可信的体外模型, 用于药物免疫毒性、免疫机制的研究以及自制制剂和参比制剂的一致性评价。该评价模型应该包括: 本底均一、补体因子完整且具有活性、能够稳定保存的血清, 一个能够标定不同检测批次差异的标准血清对照, 合适的检测指标以及结果的评价标准。

将 40 例个体的血清取相等的量混合后, 形成标准反应血清, 可以避免个体间存在的免疫差异, 并且简化实验操作, 将其分装后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 长期保存。通过检测, 标准反应血清的 3 条补体途径的所有补体因子都具有活性, 按照试剂盒的计算方法, 其补体途径活性分别为: CP 途径 79.6%、MBL-P 途径 97.2% 和 AP 途径 90.7%。此外, 考察了标准反应血清在经过 3 次冻融后补体活性的变化, 通过结果可以发现, 在冻融 3 次的过程中, 血清中补体因子没有自发激活或失活。上述实验证明标准反应血清的补体因子完整、具有活性, 且在保存过程中稳定。

根据文献^[11]的方法, 通过向反应血清中加入 HAIgG 和 zymosan A, 得到 3 条补体途径都被激活的血清, 该血清中所有的补体因子都处于激活状态, 且该标准血清在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可以稳定放置 30 天或反复冻融 10 次后, 大多数补体因子的含量都不会发生改变。通过检测, 激活的血清样品中 C5a、Bb、C4d 和 SC5b-9 的含量都有明显升高。将该激活血清作为标准对照血清, 分装后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 长期保存。利用该标准血清, 可以标定不同检测批次之间的差异, 使不同批次检测的样品之间具有可比性。

由于 SC5b-9 为 3 条补体途径的共同终产物, 且生成后含量不会发生改变。因此, 在不能确定某种药物是否可以激活补体时, 应先检测 SC5b-9 含量的变化。而 C4d 和 Bb 作为 CP 和 AP 途径的特有因子^[13], 在区分药物激活的不同补体途径时, 可以选择 C4d

和 Bb 作为检测指标。过敏毒素 C3a 和 C5a 可以直接与效应细胞上的受体结合, 使效应细胞释放细胞因子, 从而产生过敏反应^[1], 因此, 还应该检测补体因子 C3a 或 C5a。

有研究表明, 药物激活血清中 SC5b-9 浓度与 baseline (PBS 组) 相比, 如果增加在 30%~100% 之间, 被认为是温和的补体反应, 临床上出现过敏反应的可能性极小; 增加 100%~300%, 被认为在临床上出现过敏反应的风险增加; 当浓度增加超过 300% 时, 被认为在临床上会出现补体激活、发生过敏反应风险较高^[13]。因此, 本研究建立的体外模型中各补体因子的评价也参照上述标准。

在本研究中, 通过检测 SC5b-9 的含量来判断脱氧胆酸钠和磺丁基醚- β -环糊精作为增溶剂的两种制剂 d-AmB 和 Vfend 能否激活补体, 结果表明 d-AmB 能引起 SC5b-9 含量的增加, 而 Vfend 则不能。这一结果可能是因为脱氧胆酸钠是离子型表面活性剂, 在 d-AmB 的制剂中也可以形成胶束^[15], 而这种胶束结构可能是引起补体激活的主要原因。

通过比较两性霉素 B 的 3 种不同处方激活补体能力的差异, 发现 d-AmB 和 Ambisome 组与 NC 组相比, SC5b-9 的含量增加均在 100%~300% 之间, 而 ABCD 则小于 100%, 这说明 d-AmB 和 Ambisome 在临床上激活补体的风险更大, 并且 Ambisome 可能同时激活 CP 和 AP 途径, 而 d-AmB 则可能只激活 AP 途径。

利用市售和自制两性霉素 B 脂质体体外补体激活能力的异同来评价其一致性, 分别检测了 SC5b-9 和 C5a 两个指标, 其中 3 批市售制剂的 SC5b-9 含量增加基本一致, 而 C5a 含量变化较大, 这一结果可能是由于 SC5b-9 作为补体激活反应的终产物, 在血清中含量较高且较稳定, 而 C5a 含量较低检测时误差加大。两批自制制剂与市售制剂相比, SC5b-9 和 C5a 都有显著差异, 说明这两批样品在粒子属性方面与市售制剂仍存在差异, 需对工艺进行进一步的摸索和调整。然而, 就评价制剂一致性而言, 首先应该使用更多批次的市售制剂, 通过多次检测, 确定市售制剂激活血清中补体因子的含量范围, 以该含量范围为标准, 判断自制制剂与市售制剂的一致性才更为合理, 本研究仅提供一种方法。

结论

本研究通过将采集到的 40 例健康志愿者的新鲜

血清混合, 得到一份用于体外补体活性检测的标准反应血清, 经检测该血清均一、稳定且 3 条补体途径的补体因子都具有活性; 通过加入 HAIgG 和 zymosan A 激活反应血清, 得到一份 3 条补体途径中的因子都被激活的标准阳性对照, 该对照可用于比较多次检测间的结果; 此外, 还确定了检测指标和结果评价标准, 建立起用于评价药物对补体活性影响的体外模型。利用该模型, 对几种抗真菌制剂进行初步研究, 表明该模型可应用于药物免疫毒性、免疫机制的研究, 以及自制制剂和参比制剂的一致性评价研究。

References

- [1] Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity [J]. *Toxicology*, 2005, 216: 106–121.
- [2] Demoly P, Lebel B, Messaad D, et al. Predictive capacity of histamine release for the diagnosis of drug allergy [J]. *Allergy*, 1999, 54: 500–506.
- [3] Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy caused by liposomes, micellar carriers of intravenous drugs and radiocontrast agents [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2001, 18: 567–606.
- [4] Szebeni J, Alving C. Complement-mediated acute effects of liposome-encapsulated hemoglobin [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1999, 27: 23–41.
- [5] Szebeni J, Baranyi B, Savay S, et al. Liposome induced pulmonary hypertension: properties and mechanism of a complement-mediated pseudoallergic reaction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279: H1319–H1328.
- [6] Szebeni J, Baranyi B, Savay S, et al. The role of complement activation in hypersensitivity to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil[®]) [J]. *J Liposome Res*, 2000, 10: 367–381.
- [7] Hastings KL, Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration. Implications of the new FDA/CDER immunotoxicology guidance for drugs [J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2: 1613–1618.
- [8] Szebeni J, Storm G. Complement activation as a bioequivalence issue relevant to the development of generic liposomes and other nanoparticulate drugs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468: 490–497.
- [9] Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: a stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biological [J]. *Mol Immunol*, 2014, 61: 163–173.
- [10] Seelen MA, Roos A, Wieslander J, et al. Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA [J]. *J Immunol Methods*, 2005, 296: 187–198.
- [11] Bergseth G, Ludviksen JK, Kirschfink M, et al. An international serum standard for application in assays to detect human complement activation products [J]. *Mol Immunol*, 2013, 56: 232–239.
- [12] Szebeni J, Bedocs P, Rozsnyay Z, et al. Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress in pigs: factors promoting reactogenicity of Doxil and AmBisome [J]. *Nanomedicine*, 2012, 8: 176–184.
- [13] van den Hoven JM, Nemes R, Metselaar JM, et al. Complement activation by PEGylated liposomes containing prednisolone [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 49: 265–271.
- [14] Weiszhar Z, Czucz J, Révész C, et al. Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20 [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 45: 492–498.
- [15] Hamill RJ. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity [J]. *Drugs*, 2013, 73: 919–934.